

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭64-2585

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和64年(1989)1月6日

C 12 N 15/00
 1/20
 //(C 12 N 15/00
 C 12 R 1:465)
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:465)

A-8412-4B
 G-8515-4B

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全21頁)

⑮ 発明の名称 チトクロームP-450遺伝子を含有するDNA

⑯ 特 願 昭63-48927

⑰ 出 願 昭63(1988)3月2日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)3月2日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-45127

㉑ 発 明 者 馬 目 太 一 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

㉒ 発 明 者 保 志 野 恵 美 子 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

㉓ 出 願 人 三 共 株 式 会 社 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

㉔ 代 理 人 弁 理 士 櫻 出 庄 治

明 細 書

地図を有するDNA断片。

1. 発明の名称

チトクロームP-450遺伝子を含有するDNA

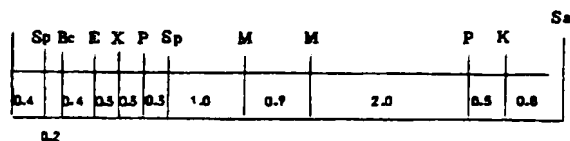
(BglⅡ/MboⅠ)

2. 特許請求の範囲

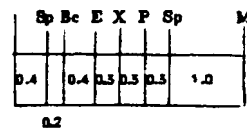
1. 放線菌のチトクロームP-450遺伝子を含有し水酸化活性を宿主に付与しうるDNA断片。

2. P-450遺伝子を含有し水酸化活性を宿主に付与しうるDNAが、ML-236Bナトリウム塩(ML-236B Na)をCS-514へ変換する能力を有する放線菌の染色体に由来する約7.1 kbのDNA断片であって下図で表わされる制限酵素切断地図を有する特許請求の範囲第1項記載のDNA。

(BglⅡ/MboⅠ)



3. P-450遺伝子を含有領域が約2.9 kbのDNA断片であって下図で表わされる制限酵素切断



4. DNAがプラスミドpHYO1, pHYO2またはpHYO21である特許請求の範囲第1項記載のDNA。

5. 特許請求の範囲第3項記載のDNA断片を含むプラスミドpHYO23であるDNA。

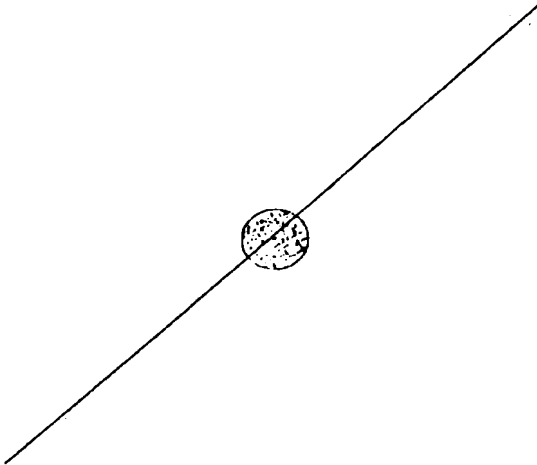
6. DNAとしてプラスミドpHYO1, pHYO2, pHYO21またはpHYO23を含有する微生物。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はストレプトミセス属に存在し、水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450の生成に関与する遺伝子部分を含有するDNAの単離およびその利用に関する。さらに詳しくはストレプトミ

セス属に存在し ML-236B ナトリウム (以下、「ML-236B Na」という) を 6 β -ヒドロキシ-ML-236B ナトリウム (以下、「CS-514」という) へ変換する水酸化酵素活性を有するナトクローム P-450 を包含する蛋白質の生成に関し、制限酵素 Mbo I の部分消化によって生成され、約 7.1 kb からなる DNA 断片中に存在し水酸化酵素活性を有するナトクローム P-450 遺伝子を含む



S. lividans など) では宿主・ベクター系が確立され種々の放線菌遺伝子がクローニングされている。それらは例えば抗生物質の生産に関する遺伝子としてのアクチノロジン生合成遺伝子 (*Nature*, 309, 482 (1984)), エリスロマイシン生合成遺伝子 (*Bio technology*, 2, 808 (1986)) などである。アクチノロジン生合成遺伝子を同様の抗生物質であるメダルマイシンの生産菌ストレプトミセス・エス・ビーに導入すると新規抗生物質のメダルロジンが生産されたとの報告がある (*Antimicrob. Agents Chemother.*, 29, 13 (1988))。また放線菌の酵素遺伝子もエンドグリコシダーゼ B 遺伝子 (*J. Biol. Chem.*, 256, 10840 (1981)) をはじめとしていくつかの報告がある。

発明が解決しようとする問題点

上述のごとく放線菌の遺伝子のクローニングに関する報告は増えつつあるものの、抗生物質生産、生理活性物質生産、微生物変換能など放線菌の能力の多様性を考慮するとこれらの研究

することを特徴とする DNA に関する。

従来の技術

微生物を用いる DNA 組み換え実験は特に大腸菌を中心として枯草菌、酵母において発展してきた。なかでも大腸菌の DNA 組み換え実験の発展はめざましく、種々の遺伝子の解析のみならずある種の有用ペプチドの工業生産にまで応用されるに至っている。一方、放線菌は抗生物質や生理活性物質などの二次代謝産物の生産に関して多種多様な能力を有すること、あるいは微生物変換において種々機能を発揮することから、薬工分野では古くから重要視されてきている。にもかかわらず放線菌の育種の手法は限られており、この限られた手法の中で生産性向上などに成果をあげてきた。このような状況のもとで放線菌の育種改良研究の1つの手法として、DNA 組み換え実験系の確立が望まれ、その手法を用いての生産性向上や新規物質の生産が期待されるようになってきた。現在、放線菌の特定菌株 (*S. coelicolor* A1312,

ははじまつたばかりである。特に放線菌を用いての微生物変換に関する酵素の遺伝子については、工業上の重要性にも拘わらずいまだにクローニングされた例がない。従って、放線菌の組み換え DNA 技法をこのような放線菌の育種改良に用いることが望まれている。

問題点を解決する手段

本発明者らは、微生物変換に用いられるストレプトミセスの特定の酵素の産生に係る遺伝子を含む DNA を提供すべく研究した。その結果、ML-236B Na の 8 β 位を水酸化し CS-514 へと変換させ得る水酸化酵素遺伝子を含む DNA をストレプトミセス属に属する菌株から分離することに成功した。ML-236B Na から CS-514 への水酸化活性を欠失しているか、または活性の低い例えばストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) に、該 DNA を組み込んだプラスミドを導入することにより、係る遺伝子が発現し、ML-236B Na から CS-514 への変換が可能であることから該 DNA

を含有する組み換えプラスミドを工業生産に用いられる例えばストレプトミセス・カルボフィラスに導入することにより、その遺伝子の増幅効果によつて、変換効率の良い株または単位基質 (ML-236B Na) あたりの変換時間の短い株の造成が期待できることを見出し、本発明を完成した。

本発明によれば、ML-236B Na の 8β 位を水酸化して CS-514 へ変換しうる水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子に関し、該遺伝子の DNA 断片を含有する組み換えプラスミドが提供される。

本発明のチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA 断片は、ML-236B Na を基質とし、CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 の遺伝子を含むものであれば、それが他の種類の基質をも水酸化するものであつてもよい。また、チトクローム P-450 遺伝子を含む DNA 断片の起源としては、特にその種類を問わず、ML-236B Na の

確認でき、宿主域の広いプラスミドがよい。

従つて、そのようなプラスミドとしてはチオストレプトン耐性が付与され、且つ本来 pIJ 702 のメラニン産生遺伝子を発現できない放線菌においてもメラニン産生遺伝子を発現できるように設計され、広い宿主で用いることの可能な例えばプラスミド pMEL16, pMEL18, pMEL25 (特開昭 61-183316 号) が好適である。

本発明で提供するチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA はベクタープラスミドにチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA を含有したものであればよく、例えば本発明者の命名するところの後述するプラスミド pHYO1 や宿主菌の中でプラスミド pHYO1 が組み換えられた結果生じたプラスミド pHYO2 またはそれから誘導されるプラスミド pHYO21 を挙げることが出来る。

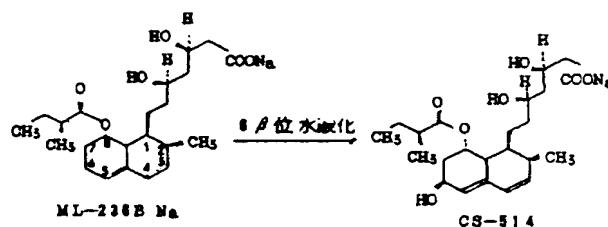
ここに ML-236B Na の 8β 位を水酸化し CS-514 の生成に因与する水酸化酵素活性

8β 位を水酸化し CS-514 を生成する能力を有する放線菌の染色体 DNA に由来するものが好適に用いられる。そのようなものとしては例えばストレプトミセス・フラボビレンス (*Streptomyces flavovirens*) などを挙げることが出来る。

他方、ベクタープラスミドとしては放線菌内にあつて自増殖可能であり、かつ宿主細胞の分裂に因して安定に娘細胞に受け継がれていく安定保持性に優れたものであればよく、使用する宿主によつて自由に選ぶことが出来る。ベクタープラスミドの具体的なものとしては例えば公知の pIJ 702 (Katz et al., J. Gen. Microbiol., 128, 2703 (1983)) 等を挙げることが出来る。

しかしながら、ベクタープラスミドは本発明の DNA を含む組み換えプラスミドを含有する形質転換体のスクリーニングに適した特定の抗生物質耐性を付与する遺伝子を有し、且つ挿入失活によつて組み換えプラスミドであることが

を有するチトクローム P-450 遺伝子は下図



で示されるように ML-236B Na の 8β 位の水酸化反応を触媒する水酸化酵素産生に因与する DNA をいう。

本発明のチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA を含有する組み換えプラスミドの調製はそれ自体公知の方法で行なうことが出来る (例えば D.A. Hopwood 著 "Genetic manipulation of Streptomyces", a Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985)。

組み換えプラスミドの調製方法

(1) ベクタープラスミド

ベクタープラスミドとしては上述のように放線菌で安定に複製増殖を維持出来るものであれば、何でも用いることが出来るが、それらから使用目的に応じて誘導されるものも含まれる。例えばストレプトミセス・リビダンス 8AMX 88182 [農工研条寄第1141号 (FERM BP-1141)] を用いてそれ自体公知の方法 (例えば D.A. Hopwood ら, "Genetic Manipulation of Streptomyces", A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985) により採取出来るプラスミド pIJ702 をベクターとして用いることが出来る。また、プラスミド pIJ702 のメラニン産生遺伝子を発現出来ない放線菌宿主でも使用出来るように調製されたプラスミド pMEL18, pMEL18, pMEL25 も同様に用いることが出来る。これらのプラスミドは選別標識 (マーカー) としてチオストレプトン耐性 (以下, 「Tn^{or}」という) とメラニン産生 (以下, 「Mel⁺」という) が付与されており, Tn^{or}, Mel⁺ を示す形質転換体を選別するこ

スミドによる宿主菌の形質転換を行なった後、例えば Tn^{or}・Mel⁺ を示す組み換えプラスミド含有形質転換体を選別する。次いで選別された形質転換体から目的の形質を発現する形質転換体を選別することにより行なうことが出来る。前述のプラスミド pMEL18 をベクターとして使用する場合を1例として挙げれば、次の通りである。即ち、染色体 DNA を制限酵素 MboI により 3~20 kb の DNA 断片となるよう部分分解 (例えば T.Maniasis ら, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 282 頁, 1982) し、得られる該 DNA 断片を、Bgl II により切断調製した pMEL18 と混合し、さらに T4 DNA リガーゼで連結処理する。これによつて、染色体 DNA の断片が導入された目的の組み換えプラスミドを含有する連結混合物を得る。連結混合物から目的の組み換えプラスミドを選別するには、該混合物を ML-238B Na の 8 β 位を水酸化し CS-514 へ変換する能力を本来持たないもしくは極めて低い能力し

とにより組み換えプラスミドの調製に有利に用いることが出来る。

(2) 水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA のクローニング

上述の ML-238B Na の 8 β 位を水酸化し CS-514 に変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む放線菌 (例えばストレプトミセス・フラボビレンスなど) の菌体より染色体 DNA を公知の方法、例えば Marmur の方法 (J.Mol.Biol., 3, 208 (1961)) で抽出する。抽出された染色体 DNA を適当な制限酵素により切断すれば、目的のチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA 断片が他の DNA 断片と共に得られる。このようにして得られる DNA 断片の混合物から目的の遺伝子を含む DNA を含有する組み換えプラスミドを調製するには、まずチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA 断片の末端と結合し得るように処理されたベクタープラスミドへ該 DNA 断片を組み込む。次に生成された各種の組み換えプラ

カ持たない放線菌のプロトプラストに導入し、寒天平板上に塗抹する。次いで培養した寒天平板上、チオペブチンを加えた軟寒天培地を重ねる。重ね後、該寒天平板を培養すると Tn^{or} を示す形質転換株が生育してくる。このなかで組み換えプラスミドを有する形質転換株はメラニンを産生しないので容易に判別可能である。次いで選別されたメラニンを産生しない形質転換株は ML-238B Na を添加した寒天平板上に移植して培養し、コロニーを十分に生育させる。このコロニーをトロツカーで打抜き寒天プラグ10個を1つの集団としてマイクロチューブに入れ、エタノール水溶液を加えよく撹拌、抽出した後、遠心分離しその上清を高濃液体クロマトグラフィー (以下, 「HPLC」という) に付す。次いで CS-514 に由来するピークの存在の有無を判別するという一次スクリーニングに供した。

二次スクリーニングは一次スクリーニングで

CS-514 に由来するピークの存在が認められた集団に含まれるコロニーから夫々をチオペプチンを含む培地に接種し振盪培養する。次いで ML-238B Na を添加しさらに振盪培養を継続した後、その培養液をマイクロチューブに採取し、遠心分離し上清を採取する。採取した上清を HPLC に付し ML-238B Na の 6 β 位を水酸化し CS-514 に変換しているクローンを選別する。このように CS-514 を生成するクローンが本発明の水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA を含有する組み換えプラスミドを保持する。従つてこれを前述のプラスミド抽出法によつて抽出すればベクタープラスミドに ML-238B Na の 6 β 位を水酸化し CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA が含有された組み換えプラスミドを取得出来る。このようにして得られた組み換えプラスミドとして例えば具体的にはプラスミド pHYO1 またはプラスミド pHYO2 を挙げることが出来る。

を宿主としてプラスミド pHYO1 を用いて再形質転換すると得られる再形質転換株はすべて ThioF となると共に水酸化活性の復帰および CO 差スペクトルによる 450 nm 付近の吸収極大の復帰が認められることおよびこの再形質転換株からプラスミド pHYO1 が分離できることから確認される。しかしながら、このプラスミド pHYO1 は第2図から明らかな如く、小型化するには不都合である。小型化の研究には以下に述べるプラスミド pHYO2 を用いた。

(II) プラスミド pHYO2 の存在確認とプラスミド pHYO21 の誘導

プラスミド pHYO1 の形質転換によつて、ML-238B Na を CS-514 へ変換する能力を示す形質転換株の1株から分離された組み換えプラスミドは、プラスミド pHYO1 以外にはほぼ同じ大きさのプラスミド pHYO2 が存在していることが判明した。即ち、プラスミド pHYO1 は Sac I 消化によつて約 10 kb および約 5.8 kb の DNA 断片を生成することとわ

る

(3) 組み換えプラスミドの具体的説明

上述の方法によつて得られる組み換えプラスミド pHYO1 およびプラスミド pHYO2 (実施例並びに第2図および第3図参照)、更にプラスミド pHYO2 から誘導されるプラスミド pHYO21 (第4図参照)について、具体的に述べる。

(1) プラスミド pHYO1 による水酸化酵素活性の確認

プラスミド pHYO1 の含有する挿入 DNA 断片が、ML-238B Na の 6 β 位を水酸化して CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含むことは次のことから理解される。即ちプラスミド pHYO1 を含有する組み換え株からこのプラスミドを除去することによつて生ずるプラスミド除去株はチオペプチン感受性となり、同時に水酸化活性の消失と CO 差スペクトルによる 450 nm 付近の吸収極大の消失を伴うことから理解される。さらに該プラスミド除去株

かつているが(第2図参照)、該プラスミド混合物は Sac I は消化によつてプラスミド pHYO1 に由来する約 10 kb および約 5.8 kb の DNA 断片の他にプラスミド pHYO2 に由来する約 13.1 kb および約 2.4 kb の DNA 断片を生成する。そこで該プラスミド混合物を用いてストレプトミセス・リビダンスを形質転換し、Sac I 消化によつて約 13.1 kb と約 2.4 kb の DNA 断片を生ずるプラスミドのみを含む形質転換株を分離することによつてプラスミド pHYO2 を単独に含む形質転換株が得られる。この形質転換株は ML-238B Na から CS-514 へ変換する能力を有していることからプラスミド pHYO2 もプラスミド pHYO1 と同様に ML-238B Na の 6 β 位を水酸化して CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む挿入 DNA 断片を持つていることになる。プラスミド pHYO2 は該プラスミドを単独に含む形質転換株から調製することが出来る。

第3図に示すプラスミドpHYO2の制限酵素切断地図を作成することにより、該プラスミドのベクター部分に存在するSph Iサイトを含む約300 bpが欠失していること、水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含む約1.0 kbの挿入DNA断片において宿主菌体内において、少なくともSac IからSph Iサイトまでの約8.7 kbを含む約7.1 kbのDNA断片が組み換えを受け、pHYO1の挿入DNA断片における当該部分と相同域が逆向きに配位されたものであることが理解される。このように少なくとも約8.7 kbのDNA断片が逆向きに配位されたにも拘わらずML-236B NaがCS-514への交換を受けることは、ML-236B NaをCS-514へ交換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子が、少なくともSac IからSph Iサイトまでの約8.7 kbを含む約7.1 kbのDNA断片内に位置していること、および該チトクロームP-450遺伝子のプロモ-

ーター領域も含有されていることを示唆する。

前述のごとくプラスミドpHYO2において、Sac IからSph Iサイトまでの約8.7 kbを含む約7.1 kbのDNA断片内に水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子が含まれているということは、Sac I消化によって生ずる約2.4 kbのDNA断片は水酸化酵素活性の発現には不要であることを示す。従つてこの約2.4 kbのDNA断片を除去することによつてプラスミドの小型化が可能であることは容易に理解される。まずプラスミドpHYO2をSac Iで消化し、約1.1 kbと約2.4 kbのDNA断片を得、次いで加熱処理したのちT₄ DNAリガーゼで連結し連結混合物を得る。次いでストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入し、前述の方法によつて形質転換株を得る。さらにこれらの形質転換株は前述の二次スクリーニングと同じ方法によつて培養されHPLCにてCS-514を生産するクローンを選別する。次いで選別され

たクローンについて前述のプラスミド抽出法によつてプラスミドを抽出取得出来る。かくして得られる具体的なものとしては第4図に示す約1.3.1 kbから成りSac I切断サイトが1ヶ所となったプラスミドpHYO 21を挙げることが出来る。第4図はプラスミドpHYO 21の制限酵素切断地図を示すが、該プラスミドはプラスミドpHYO2におけるSac I消化によって生ずる約2.4 kbのDNA断片に相当する領域が除去されたこと以外はプラスミドpHYO2と同一であることが示される。

(四) チトクロームP-450遺伝子局在領域の決定

プラスミドpHYO 21の挿入DNA断片約7.1 kb内にML-236B NaからCS-514へ交換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450が位置していることはすでに述べた。次に、この約7.1 kb挿入DNA断片内のどの領域にチトクロームP-450遺伝子が局在するかを検討した。その検討方法は挿入DNA断片内にある制限酵素部位を利用して行なった。即ち、pHYO 21をSph Iで完全に消化した後、アガロース・ゲル電気泳動すると約1.1.6 kbと約

1.5 kbのDNA断片に切断されていることがわかる。この約1.1.6 kb DNA断片を含むゲルを切出し、電気泳動法によつて該DNA断片を得、これをT₄ DNAリガーゼで連結処理した後、ストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入する。

かくして得られた形質転換株はプラスミドpHYO 21の約7.1 kb挿入DNA断片から約1.5 kbのSph I断片を欠失した約5.6 kbの挿入DNA断片を含む約1.1.6 kbのプラスミドpHYO 22を含有している。またプラスミドpHYO 21をMlu Iで完全に消化した試料をアガロース・ゲル電気泳動すると約8.6 kb、約3.6 kb(ベクターDNA断片の約0.3 kbを含む)および約0.9 kbのDNA断片に切断されていることがわかる。このなかの約8.6 kbのDNA断片を含むゲルを切出し、電気泳動法によつて該DNA断片を得、これをT₄ DNAリガーゼで連結処理した後、ストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入する。かくして得られた形質転換株はpHYO 21の約7.1 kbの挿入DNA断片からMlu I消化によって生ずる約4.2 kbのDNA断片を欠失

した約 2.9 kb の挿入 DNA 断片を含む約 8.6 kb のプラスミド pHYO 23 を含有している。

次に、これらのプラスミド pHYO 22 およびプラスミド pHYO 23 を含有する形質転換株について前述の二次スクリーニングと同じ方法によって培養され HPLC にて CS-514 の生成量を調べると同時に、菌体を超音波破碎したのち遠心分離して得られる無細胞抽出液について Ohmura らの方法 (J. Biol. Chem., 239, 2370, 1964) に従い、還元型 CO 差スペクトルによりテトクローム P-450 の有無を判定した。

第 7 図はその結果を示すがテトクローム P-450 遺伝子は pHYO 23 の挿入 DNA 断片約 2.9 kb 内に存在することが示される。また、ML-236B Na から CS-514 への十分な変換活性を宿主ストレプトミセス・リビダンスに与えるためには約 7.1 kb の領域が必要であることが示される。

なお、本発明において使用される放線菌の詳細な説明は次の通りである。

して用いた臨界点乾燥を行った。乾燥サンプルにはイオンコーター IB-3 型を用い、金の膜の厚さが約 200 Å になる様に蒸着した。観察は走査電子顕微鏡 MSM-4 型 (日立明石) によった。この時の加速電圧は 25 kV である。

表 1 形態的特徴 (28℃, 10日間観察)

胞子病形態	直立～曲伏
胞子表面	平滑
胞子連鎖数	50個以上
気菌子分枝	単純分枝
特殊器官	なし

1. ストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684

(農工研第 9170 号)

本発明に用いた ML-236B Na から CS-514 への変換能を有するストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684 の形態的特徴及び生理的特徴は次の通りである。なお各種寒天培地の調製、種培養、本培養及び結果の観察は ISP 基準、応用微生物工業基準、ワックスマンの勧告などに従った。各種培地上の生育色調は「色の基準」(日本色彩研究所版)に従った。

1) 形態学的特徴

形態学的特徴は光学顕微鏡観察のほか、下記の要領で調製したサンプルを用いた電子顕微鏡観察も行った。

菌体の固定には 2% オスミウム酸を用い、室温下約 10 時間蒸気固定した。固定サンプルを寒天培地のまま、50, 70, 80, 90, 95, 100% の各濃度のエタノールで 15 分間脱水し、媒介液酢酸インアミルで置換した。乾燥は、臨界点乾燥装置 HCP-1 を使用し、液体炭酸を移行液と

2. 各種培地上の培養性状

表 2 (28℃, 14日間観察)

イースト・麦芽寒天 (ISP 2)	G	非常に良好 薄オリーブ (6-7-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰 (2-7-11~N-7)
	R	オリーブ灰 (2-4-10)
	SP	なし
オートミール寒天 (ISP 3)	G	非常に良好 明るいオリーブ (6-5-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰 (2-7-11~N-7)
	R	オリーブ (4-4-11)
	SP	なし
スターチ・無糖塩寒天 (ISP 4)	G	良好 明るいオリーブ灰 (4-8-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰 (2-7-11~N-7)
	R	明るいオリーブ灰 (4-6-11)
	SP	なし
グリセリン・ アスパラゲン寒天 (ISP 5)	G	あまり良くない オリーブ黄 (8-8-11)
	AM	やや少い 灰 (N-7)
	R	薄オリーブ (8-7-11)
	SP	なし

ペプトン・イースト エキス・鉄寒天 (ISP 6)	G	良好 明るい茶味灰(1-8-10)
	AM	〃 灰味白 (N-9)
	R	薄黄味茶 (6-7-9)
	SP	なし
チロシン寒天 (ISP 7)	G	良好 明るいオリブ(6-5-11)
	AM	〃 黄味灰~灰(2-9-12~N-7)
	R	明るいオリブ(6-5-11)
	SP	なし
シュクロース・ 硝酸塩寒天	G	あまり良くない 色なし
	AM	やや少い 明るい茶味灰(1-7-6)
	R	明るいオリブ灰(4-7-11)
	SP	なし
グルコース・ アスパラギン寒天	G	あまり良くない 薄黄(6-9-11)
	AM	やや少い 黄味灰~灰(2-9-11~N-7)
	R	薄黄~オリブ灰(6-9-11~3-7-12)
	SP	なし
栄養寒天 (Difco)	G	あまり良くない 明るいオリブ灰(2-8-11)
	AM	良好 灰味白 (N-8)
	R	オリブ灰 (3-7-10)
	SP	なし

G:生育 AM:気菌糸 R:裏面 SP:可溶性色素

4. 炭素源の酸化性

表 4

D-グルコース	+	D-マンニトール	+
L-アラビノース	+	D-フルクトース	±
D-キシロース	+	L-ラムノース	+
イノシトール	-	シュクロース	-
ラフィノース	-		

+:良く変化する +:変化する -:変化しない

5. 細胞壁化学組成

Beckerらの方法(Appl. Microbiol. 12, 236, 1965)に依る分析の結果、細胞壁主要構成物質としてLL-ジアミノピメリン酸およびグリシンを検出した。細胞壁型はI型である。

以上の結果を要約すると、SANK 63684は直状~曲状の胞子柄を示し、その先端に50個以上の胞子連鎖を形成する。胞子表面は平滑である。菌生菌糸は薄オリブ~黄~明るい茶味灰の生育をし、灰味白~オリブ灰~灰色の気菌糸を

3. 生理的性質

表 3

スターチの加水分解		陽 性
ゼラチンの液化		〃
ミルクの凝固	26℃	陰 性
	37℃	陽 性
ミルクのペプトン化	26℃	〃
	37℃	〃
硝酸塩還元	〃	〃
メラニン様色素生産性(培地1)		陰 性
	(培地2)	〃
	(培地3)	〃
生育温度範囲(培地4)		15~40℃
食塩耐性(〃)		7%

* 培地1:トリプトン・イーストエキスブロス(ISP1)

2:ペプトン・イーストエキス・鉄寒天(ISP6)

3:チロシン寒天(ISP7)

4:イースト・麦芽エキス寒天(ISP2)

増生する。気菌糸は粉状であり培養後期に硬固化(byscospis)に伴う黒い斑点が見られる場合もある。また、可溶性色素およびメラニン様色素は産生しない。細胞壁型はLL-DAPとグリシンを含むI型である。

これらの諸性状から、SANK 63684はストレプトミセス属に属することは明らかである。既知ストレプトミセス属の中でも特に近縁の種としてストレプトミセス・フラボビレンスが挙げられる。そこで、ストレプトミセス・フラボビレンスISP 5062株と本菌株の同時比較培養を行った。その結果、両菌株間には形態的諸性状および生理的諸性質において、ほとんど差異は認められなかった。従って、SANK 63684はストレプトミセス・フラボビレンと同一種と考えられ、本菌株をストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684と同定した。

2. ストレプトミセス・リビダンス SANK 68182

【微生研集第1141号(FERM BP-1141)】

E. Katzによって構築されたプラスミドpIJ702を保持するストレプトミセス・リビダンス3131

である(J. Gen. Microbiol. 129, 2703 ~ 2714, 1983)。

3. ストレプトミセス・リビダンス SANK 63086

(農工研菌寄第 9 1 6 9 号)

ストレプトミセス・リビダンス TK 21 である。本書は "Genetic Manipulation of Streptomyces", A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985 に記載されており、放線菌の宿主として世界中で用いられている。

4. ストレプトミセス・リビダンス SANK 60587

(農工研菌寄第 9 1 6 8 号)

本発明者らによって構築されたプラスミド pMEL 18 (特開昭 62-122585, J. Antibiotics, 40, 1440 ~ 1447, 1987) を保持するストレプトミセス・リビダンス TK 21 株である。

5. ストレプトミセス・ジューモンゾネンシス [16]-8・

SANK 61185 [農工研菌寄第 1 1 4 0 号 (FERM BP-1140)]

本書の形態学的諸性質及び生理的諸性質については特開昭 62-122585 号公報において詳細

に述べている。
Gc⁺ 増地 100 ml の入った 500 ml 遮光口フラスコに 5 量接種し 28℃ で 24 時間往復揺盪機で培養した。この培養液から低速遠心で菌糸体を得、この菌糸体から Marbur の方法 (J. Mol. Biol., 1, 208, (1961)) に準じて全 DNA を抽出、精製し、DNA 溶解用緩衝液 (10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) で遊析して供与体 DNA とした。

このようにして得られた供与体 DNA 5 µg を、1^u の Mbo I を用いて 37℃ で反応させ、3~20 kb の DNA 断片になるよう部分分解した。この反応液は 70℃ で 10 分間処理することによって Mbo I を加熱失活させた。次いで 2.5 倍容量の -20℃ のエタノールを加え -70℃ で 30 分間放置後、15000 rpm で 3 分間遠心して DNA を沈殿させた。

他方、ベクタープラスミド pMEL 18 (参考例参照。本プラスミドはストレプトミセス・リビダンス SANK 60587 (農工研菌寄第 9 1 6 8 号) から D.A.Hopwood から "Genetic Manipulation of

Streptomyces", A Laboratory Manual, The

実施例 1. 組み換えプラスミドの調製法と形質転換

ストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684 (農工研菌寄第 9 1 7 0 号) を Gc⁺ 液体増地 (0.4% グリセロール, 0.1% グリシン, 0.4% カザミノ酸, 0.1% 硫酸マグネシウム, 0.01% 塩化カルシウム, 0.1% 酵母エキス, 微量金属塩溶液 4 ml/l) に接種し、28℃ で 3 日間揺盪培養した。これを種とし、新鮮な

Streptomyces", A Laboratory Manual, The John Innes Foundation (1985) に記載の方法によつて採取される。) の 1 µl を 3^u の Bgl II によつて 37℃, 2 時間反応させ完全に切断した。この Bgl II で切断された pMEL 18 は 70℃ で 10 分間加熱して Bgl II を失活させた後、前述と同じくエタノール沈殿させた。

以上のようにして調製した Mbo I で部分分解した供与体 DNA と Bgl II で完全切断した pMEL 18 とを、35 µl の蒸留水に溶解した。これに 10 倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液 (600 mM Tris-HCl, 60 mM MgCl₂, pH 7.5) 5 µl, 50 mM のジチオスリトール 5 µl および 10 mM の ATP 5 µl を加え全量を 50 µl とし、これに T₄ DNA リガーゼ 5^u を加え、14℃ で 16 時間反応させた。このようにして pMEL 18 とストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684 染色体 DNA との組み換えプラスミド混合物を調製した。この組み換えプラスミド混合物から目的の組み換えプラスミドを選別するため、ML-236B

Na を C8-514 へ変換する能力を本来持たないかもしくは極めて低い能力しか持たない放線菌であるストレプトミセス・リビダンス SANK 83088 (農工研菌寄 9169 号) のプロトプラストに該組換えプラスミド混合物を導入した。即ち、34% 蔗糖を含有する 0.0C⁺ 培地で 28℃ で 3 日間培養したストレプトミセス・リビダンス SANK 83088 の菌糸体を含む培養液を種とし、新鮮な 34% 蔗糖を含有する 0.0C⁺ 培地 100 ml (500 ml 容接口フラスコ) に 5% 量接種し 28℃ で 24 時間往復振盪培養した。該培養液から低速遠心で菌糸体のペレットを得、これを 28 ml の P 培地 (320 mM 蔗糖、25 mM TES 緩衝液、70 mM NaCl、10 mM MgCl₂・6H₂O、20 mM CaCl₂・2H₂O) に懸濁し洗浄した。次いで遠心し得られた菌糸体を 20 ml の P 培地に懸濁した。この菌糸体懸濁液に 40 mg/ml 濃度のリゾチーム溶液 1 ml を加え、28℃ で 1 時間加温するとストレプトミセス・リビダンス SANK 83088 株のプロトプラストが生成した。この

プロトプラストと未溶解の菌糸体の混合物をガラスフィルター (303) にて自然ろ過しプロトプラストを多量に含有したプロトプラスト液を得た。これを低速遠心しペレットを再び P 培地に懸濁した。この操作を 3 回繰返し十分洗浄することにより所望のプロトプラスト数を含有するプロトプラスト液を調製した。

得られたプロトプラスト液を遠心してペレットを得た。これに先に得られている組換えプラスミド混合物を加えおだやかに攪拌しプロトプラストを均一に分散させた。これに 20% ポリエチレングリコール 1540 を含む P 培地 0.5 ml を加え 1 分間静置した後、更に 4 ml の P 培地を加えた。この形質転換操作はすべて 0℃ で行なわれた。形質転換後、遠心してプロトプラストペレットを得た。これに 5 ml の P 培地を加え十分攪拌・洗浄し遠心した。この操作は少なくとも 3 回行ない所望量の P 培地に形質転換済のプロトプラストを懸濁し再生培地 (R₂MP 寒天平板) 上に塗抹した。

R₂MP 培地 (蔗糖 120 g, K₂SO₄ 0.25 g, K₂HPO₄ 0.05 g, MgCl₂・6H₂O 0.12 g, CaCl₂・2H₂O 2.5 g, グルコース 4 g, カザミノ酸 0.1 g, L-プロリン 3 g, DL-ノルロイシン 0.05 g, チロシン 0.5 g, 酵母エキス 2 g, 麦芽エキス 5 g, 250 mM TES 緩衝液 (pH 7.2) 100 ml, 微量金属塩溶液 2 ml, 寒天 20 g を加え 1000 ml とする) はメラニン様色素の産生を強調するために調製した培地である。R₂MP 寒天平板上に塗抹後、28℃ で 20 時間培養した R₂MP 寒天平板上に最終濃度 50 μg/ml となるようにチオペブチンを加えた軟寒天 R₃ 培地 (蔗糖 120 g, K₂HPO₄ 0.2 g, MgCl₂・6H₂O 0.1 g, CaCl₂・2H₂O 2.2 g, 250 mM TES 緩衝液 (pH 7.2) 100 ml, グルコース 10 g, 酵母エキス 4 g, ポリペプトン 4 g, KCl 0.5 g, 寒天 5 g を加え 1000 ml とする) を 3 ml 重層した。重層後、該寒天平板を 28℃ で培養を継続するとチオペブチンに耐性を示す形質転換株の生育がみられた。これらのチオペブチン耐性

の中でメラニンを産生しない株 (Mel⁻ 株) が組換えプラスミドを持つている形質転換株であるので、Mel⁻ 株を選別した。

実施例 2 ML-2388 Na の 8 β 位を水酸化し C8-514 へ変換する能力を有する形質転換株のスクリーニング

一次スクリーニングは次の通り実施した。即ち、Mel⁻ を示す選別された形質転換株を最終濃度 300 μg/ml の ML-2388 Na を添加した O₂Y 寒天平板 (2% グルコース、1% ポリペプトン、0.1% 酵母エキス、2% 寒天、pH 7.0) に移植し、28℃ で 7~10 日間培養しコロニーを十分生育させた。これらのコロニーをトロツカーで打抜き、直径 1.5 mm の寒天プラグを作製した。このようにして各々のコロニーを打抜き作製した寒天プラグ 10 個を 1 つの集団として 1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、20% エタノール 200 μl を加えよく攪拌、抽出した。次いで 18000 rpm で 5 分間遠心分離した上清を HPLC に向け、C8-514 に由来するピーク

の存在の有無を判別し一次スクリーニングとした。HPLCはカラムとしてラジアルパックC18を用い移動相として25%アセトニトリルおよび0.1%トリエチルアミン(pH 3.2; リン酸によつて調製した)の混合溶剤を用い、流速は2 ml/分で行なつた。

二次スクリーニングは、一次スクリーニングでCS-514に由来するピークの存在が認められた集団に含まれる10個のコロニーから夫々をチオペプチン25 µg/mlを含有するO.P.Y液体培地に接種し28℃で3日間振盪培養した。次いでML-238B Naを300 µg/ml濃度になるよう添加し、さらに28℃で2~3日間振盪培養を継続した。該培養液を1.5 ml容マイクロチューブに採取し、15000 rpmで5分間遠心分離して上清を採取しHPLCにかけ、ML-238B Naの8β位を水酸化しCS-514に変換しているクローンを選別した。HPLCの条件は一次スクリーニングと同じであるが状況に応じて移動相を30%アセトニトリルおよび0.1%トリ

エチルアミン(pH 3.2; リン酸によつて調製した)の混合溶剤、流速を1 ml/分に立てて行なつた。

実施例2 ML-238B Naの8β位を水酸化しCS-514へ変換する能力を有する形質転換株ストレプトミセス・リビダンスMLR-1528 No. 418株の培養とプラスミドpHYO1の調製およびストレプトミセス・リビダンスの再形質転換

実施例2に記載されたスクリーニング方法によつて、ML-238B Naの8β位を水酸化し、CS-514へ変換する能力を付与された形質転換株ストレプトミセス・リビダンスMLR-1528 No. 418株が選択された。これは、この株が特定のプラスミド(プラスミドpHYO1)を含有しているためにML-238B NaをCS-514へ変換できるようになったものと考えられる。このプラスミドpHYO1を調製し、ストレプトミセス・リビダンスを再形質転換してその確認を行なつた。

即ち、34%蔗糖を含有する0.0C⁺培地20 mlを30 ml容枝付きフラスコに入れ、これにMLR-1528 No. 418株の菌糸体を接種後、24~28℃で約12時間、120 rpmの往復振盪振上で培養した。次いで500 ml容坂口フラスコに入つた、34%蔗糖を含有する0.0C⁺培地100 mlに上記培養液の懸濁液を培地の1~5%相当量を接種し、24~28℃で24~48時間往復振盪振上で培養した。

この培養液から低速遠心(例えば10000g, 4℃, 20分)で菌糸体を集菌し、上澄液を傾斜で除いて菌糸体ペレットを得た。菌糸体ペレットを20 mlのTES緩衝液(25 mM トリスヒドロキシメチル アミノメタン(トリス), 25 mM EDTA および25 mM 食塩, pH = 7.5)に再懸濁し、次いでこの再懸濁液に40 mg/mlの濃度のリゾチーム懸液を1 ml加え、この混合物を37℃で5~15分緩く攪拌しながら加温し、次にこれに3 mlの10%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)懸液を加え、緩く混合したのち37

℃で8分間加温して溶解した。

次いでこの溶解物を40000g, 4℃, 30分遠心することで粗製溶解物を上澄として得、これに1/4容量の5M食塩を加えて最終食塩濃度を1Mとし、0℃で2~3時間冷却すると先に加えたSDSが沈殿してくるので、3000g, 0℃, 15分の遠心を行ない、SDSを除いた。この上澄液にリボスクレアーゼを加えて37℃で20分更にプロナーゼを加えて37℃で20分消化を行なつた。この消化液に40%ポリエチレングリコール(PEG)8000懸液を最終濃度10%になるよう添加し、この混合物を0℃で1晩保つと、DNAが沈殿してくるので、緩い遠心(3000g, 0℃, 15分)後上澄を捨て、沈殿物を4.7 mlのTES緩衝液に懸濁して十分に懸かし、TES緩衝液中で透析し、DNA抽出サンプルを得た。

このようにして得たDNA抽出サンプルに塩化セシウムを混合し、更に蛍光発色剤エチジウム・ブロミド(ETBr)を加え、混合して1.020

の密度の溶液を調製した。この溶液は 150,000g, 18℃ で 40 時間平衡密度勾配遠心を行ない、この遠心管に 320 nm の紫外線を照射すると、遠心管中で染色体由来の線状 DNA の強い蛍光帯の下に、閉環状のプラスミド pHYO1 の DNA が蛍光帯として分離しているのが見いだせた。

閉環状のプラスミド DNA の蛍光帯部分を採取し、これを等量のローブチルアルコールで 3 回抽出してエチジウム・ブロミドを除去し、次に水層を適当な緩衝液（例えば、10 mM トリス、10 mM 食塩および 1 mM EDTA, pH = 7.5）で透析して純粋な組み換えプラスミド pHYO1 を得た。

このようにして得られた純粋な組み換えプラスミド pHYO1 は紫外線 250 nm の吸光度から濃度が求められた。

組み換えプラスミド pHYO1 における挿入 DNA 断片の大きさはアガロース・ゲル電気泳動によつて算出された。即ち、組み換えプラスミド 0.8 kb を制限酵素 Bcl I で切断することによりベクタープラスミド pMEL18 に挿入されている

DNA 断片の大きさが判別出来る。挿入 DNA 断片の大きさは約 10 kb であることが判明した。分子量マーカーとしてラムダ DNA の Hind III 切断片または ϕ X 174 DNA の Hae III 切断片を用い、電気泳動の移動度から Bcl I 消化によつて生成する 5 つの DNA 断片の大きさを測定した。これらの総和（約 188 kb）とベクタープラスミド pMEL18 の大きさ（約 88 kb）との差を挿入 DNA 断片の大きさとした。

なお、このようにして得られた組み換えプラスミド pHYO1（第 2 図参照）を用いて実施例 1 に記載した方法でストレプトミセス・リビダンス SANK 83088（飯工研菌第 8168 号）を再形質転換した。この再形質転換によつて得られた形質転換株 50 株について ML-238B Na の CS-514 への変換能について検討したところ、すべての株で変換能が認められた。またこれらの株から分離されたプラスミドは pHYO1 であった。

実施例 4 形質転換株 MLR-1528 No. 418

からのプラスミド pHYO1 の除去と pHYO1 による形質転換

プラスミド pHYO1 が導入されたことによつて ML-238B Na を CS-514 へ変換する能力が付与された形質転換株 MLR-1528 No. 418 からアクリフラビンまたはプロトプラスト再生によつてプラスミド pHYO1 が脱落、除去された 418P-7 株を取得した。この株はプラスミド pHYO1 の除去に伴つてチオペブチンに感受性であった。また、この株は実施例 2 に記載された二次スクリーニングと同じ方法によつて CS-514 への変換能の有無を調べたところ、変換活性は認められなかった。さらにこの株について先に述べた無細胞抽出液を用いて CO 差スペクトルを測定したところ 488 nm 付近の強大吸収が消失していた。一方、対照株のプラスミド pHYO1 を保持した MLR-1528 No. 418 株においては変換活性および CO 差スペクトルにおける 488 nm 付近の強大吸収が認められた。

次いでプラスミド pHYO1 を用いてこのプラス

ミド除去株 418P-7 を実施例 1 に記載した方法で形質転換した。この形質転換で得られた形質転換株はチオペブチンに耐性となっており、また実施例 2 に記載された二次スクリーニングと同じ方法によつて CS-514 への変換活性を調べたところ変換活性は復帰していた。さらに CO 差スペクトルを測定したところ 488 nm 付近の強大吸収もまた復帰していた。このことは ML-238B Na の 6 β 位を水酸化し CS-514 へ変換する変換酵素、即ち水酸化酵素はチトクローム P-450 である可能性を示し、かつこのチトクローム P-450 遺伝子はプラスミド pHYO1 の挿入 DNA 断片中に存在していることを示すものである。

実施例 5 プラスミド pHYO2 を単独に含む形質転換株の遺伝と ML-238B Na から CS-514 への形質転換能

実施例 3 に記載したようにプラスミド pHYO1 によつて再形質転換して得られた形質転換株 50 株にはすべてプラスミド pHYO1 が存在して

いることが確認されたが、これらのうちの1株がプラスミド pHYO1 を含むほぼ同じ大きさの2種類のプラスミドを含有しているプラスミドの混合物であることが Sac I の消化によつて生成する DNA 断片の解析から判明した。

即ち、pHYO1 は Sac I 消化によつて約 10 kb および約 8.8 kb の DNA 断片を生成するが、該混合物は Sac I 消化によつてプラスミド pHYO1 に由来する約 10 kb と約 8.8 kb の DNA 断片以外に pHYO2 と命名したプラスミドに由来する約 13.1 kb と約 2.4 kb の DNA 断片を生成していた。そこでプラスミド pHYO2 を分離するために該混合物を用いて実施例 1 に記載した方法によつて形質転換を実施し、生育した形質転換株から実施例 3 に記載した方法でプラスミドを調製した。次いで該プラスミドを Sac I で消化することによつて約 13.1 kb と約 2.4 kb の DNA 断片を生ずるものを選択して、プラスミド pHYO2 を単独に含む形質転換株が得られた。プラスミド pHYO2 を単独に含む形質転換株の ML-236B

Na から CS-514 への形質転換能は実施例 2 に記載した二次スクリーニングの方法によつて測定し、形質転換能を保持していることを確認した。

実施例 6 プラスミド pHYO21 の調製

プラスミド pHYO2 はその制限酵素切断地図から、水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む約 10 kb の挿入 DNA 断片において宿主菌体内において少なくとも Sac I から Sph I サイトまでの約 8.7 kb を含む約 7.1 kb の DNA 断片が組み換えをうけプラスミド pHYO1 の挿入 DNA 断片における当該部分との相同域が逆向きに配位されたものであつた(第 3 図参照)。このように少なくとも Sac I から Sph I サイトまでの約 8.7 kb を含む約 7.1 kb の DNA 断片が逆向きに配位されたにも拘わらず ML-236B Na が CS-514 への変換を受けたことは、ML-236B Na を CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子がこの約 7.1 kb の DNA 断片内に位置し

ていることを示している。このことは、プラスミド pHYO2 の Sac I 消化によつて生ずる^約2.4 kb の DNA 断片は水酸化酵素活性の発現には不要であることを示す。従つてこの^約2.4 kb の DNA 断片を除去することが可能である。この^約2.4 kb の DNA 断片を除去した小型化プラスミド pHYO21 の調製は以下の通りに行なわれた。

プラスミド pHYO2 の 1 μg を 50 の Sac I を用いて 37℃ で 2 時間消化した。次いで 70℃ にて 10 分間加熱し Sac I を失活させた後、エタノール沈殿を行なつた。次いでこの Sac I 消化エタノール沈殿物を乾燥後、35 μl の蒸留水に溶解し、これに 10 倍濃度のリガーゼ反応緩衝液 8 μl、50 mM、ジチオスリトール 5 μl および 10 mM ATP 5 μl を加え全量を 50 μl とした。これに T4 DNA リガーゼ 2U を加え、14℃ で 16 時間反応させた。このようにしてプラスミド pHYO2 の Sac I 消化 DNA 断片をセルフライゲーションし、これを実施例 3 に記載したプラスミド pHYO1 の除去株(416P-7 株)

のプロトプラストへ実施例 1 に記載した方法によつて導入し、Thio^r を示す形質転換株を得た。次いでこれらの形質転換株から実施例 3 に記載された方法によつてプラスミドを抽出し約 2.4 kb DNA 断片を失ったプラスミド、即ち約 13.1 kb の大きさを有するプラスミドを選択した。このようにして得られたプラスミドは Sac I 切断部位を 1ヶ所持つ約 13.1 kb のプラスミド pHYO21 (第 4 図参照)である。このプラスミドは pHYO2 と同じように ML-236B Na の 6 μ 位を水酸化し CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含有する。少なくとも Sac I から Sph I サイトまでの約 6.7 kb 部分を含む約 7.1 kb の DNA 断片を持っており、プラスミド pHYO1 および pHYO2 と同じく宿主細胞に ML-236B Na から CS-514 へ変換する能力を付与する。

実施例 7 プラスミド pHYO22 の調製

プラスミド pHYO21 の 5 μg を 15U の Sph I を用いて 37℃ で 2 時間消化した。次いで 70℃ に

10分間加熱しSph Iを失活させた後、0.8%アガロース・ゲル電気泳動にかけた。アガロース・ゲル電気泳動では約1.6 kbと約1.5 kbのDNA断片が生成しており、このうち約1.6 kbのDNA断片を含むゲルを切出し、電気溶出法によって該DNA断片を溶出した。溶出液35 μ lに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5 μ l、50 mMジチオスリトール5 μ l、および10 mM ATP 5 μ lを加え全量を50 μ lとし、これにT₄ DNA リガーゼ2^uを加え14℃で16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHYO 21のSph I消化によって生ずる約1.6 kbのDNA断片をセルフライゲーションし、これを実施例3に記載した416P-7株のプロトプラストへ実施例1に記載した方法によって導入し、Thio^rを示す形質転換株を得た。次いでこの形質転換株から実施例3に記載された方法によってプラスミドを抽出した。このようにして得られたプラスミドはSph I切断部位を1ヶ所持つ約1.6 kbのプラスミドpHYO 22(第5図参照)である。このプラスミドはpHYO 21の持つ約7.1 kbの挿入

し、これを実施例3に記載した416P-7株のプロトプラストへ実施例1に記載された方法によって導入しThio^rを示す形質転換株を得た。次いでこの形質転換株から実施例3に記載された方法によってプラスミドを抽出した。このようにして得られたプラスミドはMlu I部位を1ヶ所持つ約8.6 kbのプラスミドpHYO 23(第6図参照)である。このプラスミドはpHYO 21の持つ約7.1 kbの挿入DNA断片からMlu I消化によって生成する約0.9 kbおよびベクターDNA断片の約0.3 kbを含む約3.6 kbが除かれた約2.9 kbの挿入DNA断片を持ち、宿主細胞(416P-7株)にML-236B NaからCS-514へ変換する能力を付与する。しかしその能力はpHYO 21によって付与される能力に比べると約1/3程度である。

試験例1.

- (1) ストレプトミセス・リビダンス BANK 63086
へのML-236B NaをCS-514へ変

DNA断片からSph I消化によって生成する約1.5 kbが除かれた約5.6 kbの挿入DNA断片を持っているが、宿主細胞(416P-7株)にML-236B NaからCS-514へ変換する能力を付与し得ない。

実施例8. プラスミドpHYO 23の調製

プラスミドpHYO 21の5 μ gを15^uのMlu Iを用いて37℃で2時間消化した。次いで70℃に10分間加熱しMlu Iを失活させた後、0.8%アガロース・ゲル電気泳動にかけた。アガロース・ゲル電気泳動では約8.6 kb、約3.6 kb(ベクターDNA断片の約0.3 kbを含む)および約0.9 kbのDNA断片が生成しており、このうち約8.6 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気溶出法によって該DNA断片を溶出した。この溶出液35 μ lに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5 μ l、50 mMジチオスリトール5 μ lおよび10 mM ATP 5 μ lを加え全量を50 μ lとしこれにT₄ DNA リガーゼ2^uを加え14℃で16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHYO 21のMlu I消化によって生ずる約8.6 kbのDNA断片をセルフライゲーション

換する能力の付与

それぞれ次の菌株

- (a) ストレプトミセス・リビダンス BANK 63086 (微工研菌第8168号) ;
- (b) ベクタープラスミドpMEL18を含むストレプトミセス・リビダンス BANK 63086であるストレプトミセス・リビダンス BANK 60587(微工研菌第8168号) ;
- (c) ストレプトミセス・リビダンス BANK 63086株の本発明によるML-236B NaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含むDNAを含有する組み換えプラスミドpHYO1による形質転換株であるMLR-1528・NO418株 ;
- (d) MLR-1528・NO418株からプラスミドpHYO1を除去した株である416P-7株 ;
- (e) 416P-7株のプラスミドpHYO1による再形質転換株であるRTF-88株 ;
- (f) 416P-7株のプラスミドpHYO 21によ

る再形質転換株である RTP-182 株；
これらのうち(a)のストレプトミセス・リビダ
ンス SANK83088 株と(d)の 418P-7 株
は OPY 培地に接種し、(b)のストレプトミ
セス・リビダンス SANK80887 株、(c)の
MLR-1528No. 418 株、(e)の RTP-85
株および(f)の RTP-182 株はチオペプチ
ン 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む OPY 培地に接種し、
28℃で3日間振盪培養した。次いで、これ
を種として新鮮な OPY 培地にこれを 5%
量接種した。次いで、28℃で1日振盪培
養した培養液に ML-236B Na を 500 μg
/ ml 濃度になるように添加し更に 28℃で
3日間振盪培養した。次いで 15 ml 容マイ
クロチューブに各培養液を採取し 15,000
rpm で 8 分間遠心分離した後、上清を採取
し HPLC によつて生成した CS-514 を測
定した。

CS-514 の生成量は(a)は 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(b)
は 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(c)は 358 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(d)は 1

と「チトクローム P-450 の測定」のための
無細胞抽出液の調製法は次のように行なつた。
OPY 培地で前培養した菌株を新鮮な OPY 培
地 100 ml (500 ml 容三角フラスコに入つた
もの)に 5% 量接種し 28℃で24時間固振盪
培養した。

ML-236B Na を 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう添
加し、さらに 28℃で24時間固振盪培養を
継続した。培養液を 0℃で 3,000 \times g にて 15
分間遠心分離して集菌した。水中で冷却した
0.5% 食塩水で3回洗浄後、湿菌体重量の倍
量の冷 20% (v/v) グリセロール、2 mM ジチオ
スリトールを含む 80 mM トリス-塩酸緩衝液
(pH 7.4、以下「A 緩衝液」という)を加え、
氷冷下超音波破砕した。次いで 20,000 \times g で
30分間遠心分離し、上清を採取し無細胞抽出
液とした。

ML-236B Na から CS-514 への水酸化酵
素活性測定法は各株の無細胞抽出液を次の条件
(反応液組成)

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(e)は 340 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(f)は 390
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた。このことはプラスミド
pHYO1 およびプラスミド pHYO21 が本来
ML-236B Na の 8 β 位を水酸化し CS-
514 へ変換する能力を持たないか、もしく
は極めて低い能力しか持たない宿主、スト
レプトミセス・リビダンス SANK83088
株に ML-236B Na から CS-514 へ変換
する能力を付与していることを示すもので
ある。

試験例2 プラスミド pHYO1 及びプラスミド pHYO21 保持株の水酸化酵素活性測定とチトク ローム P-450 の測定

プラスミド pHYO1 及びプラスミド pHYO21 に
よるストレプトミセス・リビダンスの形質転換
株 (MLR1528No. 418, RTP-85 および RTP-182)
対照株としてストレプトミセス・リビダンス
SANK83088 およびストレプトミセス・リビ
ダンス SANK80887 等の「ML-236B Na を
CS-514 へ変換する水酸化酵素活性の測定」

無細胞抽出液	0.8 ml
MADPH 再生系	
MADP	0.28 ml
グルコース-6-リン酸	14 mM
グルコース-6-リン酸脱水素酵素	0.5 u
ニコチン酸アミド	10 mM
塩化マグネシウム	2.5 mM
フェレドキシン・NADP ⁺ -還元酵素	0.025 u
(ホウレン草)	
フェレドキシン(クロストリジウム、 ハストイリアヌム)	5 μg
ホフファチジルコリン	2 mg
硫酸第1鉄	1 mM
ML-236B Na (基質)	233 mM
最終容量	1 ml

で 30℃で1時間振盪しながら反応させた。次い
で 5N-NaOH 80 μl を添加し pH を調整したの
ち、HPLC (カラム: ウォーターズラジアルパツ
クカートリッジ C18、流出条件: 27% アセト
ニトリル/0.1% H_3PO_4 、TEA (pH 3.2))

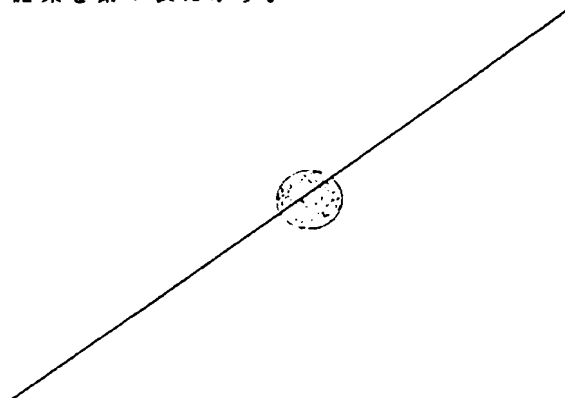
を測定した。酵素活性は酵素液1mlあたり1時間pCB-514

にて生成したCB-514が1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 生成する場合を1ユニットと定めた。

チトクロームP-450は Omura らの方法 (J. Biol. Chem., 238, 2370, (1964)) に従い還元型 Co 差スペクトルにより同定した。またチトクロームP-450は下式に従って定量した。

$$\text{チトクロームP-450 (nmol/ml)} = \frac{(0.0450 - 0.0490) \times 1000}{91}$$

結果を第1表に示す。



第1表より、ML-236B NaのCB-514への変換酵素活性は宿主(ストレプトミセス・リビダンス SANK63086)及びベクタープラスミドによる形質転換株(ストレプトミセス・リビダンス SANK60587)では検出されないがプラスミド pHYO1 による形質転換株では変換酵素活性が出現し、同時にチトクロームP-450の産生も認められる。プラスミド除去株では変換酵素活性と共にチトクロームP-450の産生は認められなくなり、該菌株をプラスミド pHYO1 またはプラスミド pHYO21 によつて形質転換することによつて変換酵素活性が再び出現し、同時にチトクロームP-450も産生されるようになる。

挿入方向の異なるDNA断片を有するプラスミド pHYO1, pHYO21 がともに、本来ML-236B NaをCB-514へ変換する能力を持たないか、または持つていても極めて低い能力の宿主であるストレプトミセス・リビダンス SANK63086 またはストレプトミセス・リビダンス

第1表

菌株	プラスミド	蛋白 mg/g	1) 変換酵素活性 u/mg蛋白	チトクロームP-450 nmol/mg蛋白
ストレプトミセス・リビダンス SANK63086	None	1.23	ND	ND(ND)
ストレプトミセス・リビダンス SANK60587	pMK119 (ベクター)	1.38	ND	ND(ND)
ML-1528 No.418	pHYO1	1.40	4.88	1.495(0.187)
416P-7(プラスミド 除去株)	None	9.8	ND	ND(ND)
RTF-85	pHYO1	7.3	6.54	0.581(0.068)
RTF-182	pHYO21	5.6	5.34	0.413(0.072)

注1) 蛋白量は Lowry 法 (J. Biol. Chem., 193, 265, (1951)) により、牛血清アルブミンを標準として測定した。

2) ND: 検出されず

416P-7 に、形質転換能と同時にチトクロームP-450の産生能をも付与することは、これらの組み換えDNAに含有される挿入DNA断片に水酸化酵素活性を有するP-450遺伝子がプロモーター領域を持ってクローン化されたことを示す。

試験例3 チトクロームP-450遺伝子の局在領域の検討

プラスミド pHYO21, pHYO22 及び pHYO23 によるストレプトミセス・リビダンス 416P-7 の形質転換株 (RTF-258, RTF-286 及び RTF-288)、対照株としてストレプトミセス・リビダンス SANK60587 等の「ML-236B NaをCB-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」と「チトクロームP-450の測定」のための無細胞抽出液の調製法、「ML-236B NaをCB-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」および「チトクロームP-450の測定」は試験例2に従って行なった。

第7図よりチトクロームP-450生産には少なくとも SphI 消化によって生じる約1.5kbの SphI断片を含む BglII/MboI のベクターと挿入DNA断片

の連結部位から *Mlu*I 切断部位までの約 2.9 kb の DNA 断片が必要であることが示される。即ちテトクローム P-450 遺伝子はプラスミド pHYO 23 の挿入 DNA 断片と *Bgl*II/*Mbo*I の連結部位から *Mlu*I 切断部位までの約 2.9 kb に存在していることになる。しかしながら宿主に ML-2368Na から CS-514 への十分な変換活性を付与するためには pHYO 21 の持つ挿入 DNA 断片約 7.1 kb が必要であると考えられる。

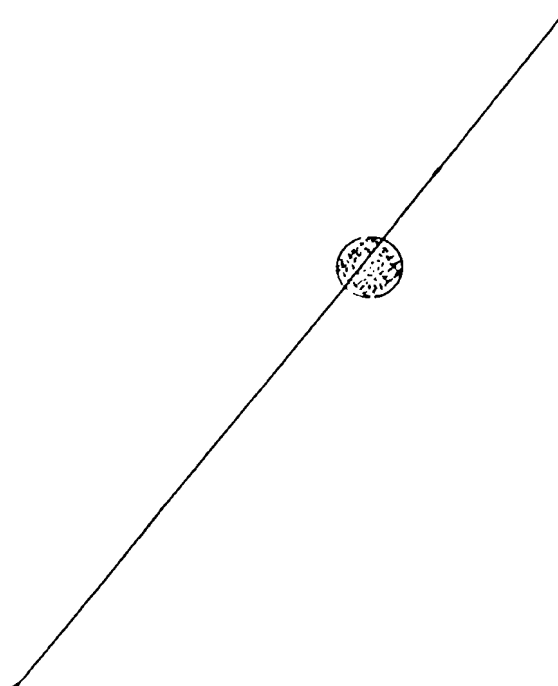
参考例 プラスミド pMEL 18 の構築と調製方法

プラスミド PIJ 702 (Katz et al., J. Gen. Microbiol., 129, 2703 (1983)) 上に存在するテロシナーゼ遺伝子 (*mel* gene) はすべてのストレプトミセスで発現されるものではない。そこで該 *mel* gene を発現し得ないストレプトミセスにおいてもメラニン産生を指標としてクローニング出来るよう設計されたプラスミド pMEL 18 を構築した。PIJ 702 の *mel* gene を発現し得ない宿主ストレプトミセスとしてストレプトミセス・シューモンジネンシス [16]-8・SANK 61185 (以下、

い宿主 [16]-8・SANK 61185 株に、該 *mel* gene を発現させ得る能力を付与する DNA 断片は全てのストレプトミセスの染色体 DNA から分離することが可能であるが、ここではストレプトミセス・エス・ビー SANK 61184 の培養菌糸体から Marmur 法 (J. Mol. Biol., 3, 208 (1961)) によつて抽出した DNA を外来性 DNA として供試した。

ストレプトミセス・エス・ビー SANK 61184 の DNA 5 μ g とプラスミド PIJ 702 の 1 μ g を混合し、次いで 4 倍濃度の制限酵素反応液 1/3 容量および制限酵素 *Spe*I 8 μ l を加えた。DNA を完全に切断するため 37℃ で 2 時間培養した後、70℃ で 10 分間加熱し制限酵素を失活させた。この試料に 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え混拌し、次いで 2 倍量の -20℃ で冷却したエタノールを加えた後、-70℃ で 18 ~ 20 分間冷却した。この試料を微量遠心機にて遠心し上清を捨て DNA 沈澱を -20℃ のエタノールで洗浄した。次いで真空中で乾

[16]-8・SANK 61185 株) (微生物研究第 1140 号 (FERM BP-1140)) を用いた。PIJ 702 の *mel* gene を発現し得な



燥し該菌懸留水にて溶解後、10 倍濃度に調製したリガーゼ反応液 (800 mM トリス・HCl, 80 mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 100 mM DTT, 1.1 mM ATP, pH 7.8) を 1/5 容量加えた。さらにこれに T4 DNA リガーゼを加え、14℃ で 18 時間インキュベート後、85℃ で 10 分間加熱しリガーゼを失活させた。これを形質転換用試料として用いた。該形質転換用試料を用いての [16]-8・SANK 61185 株の形質転換は次の通りに行なつた。即ち、50 ml 容積つきフラスコに 0.007 培地 20 ml を入れこれに [16]-8・SANK 61185 株の菌糸体を接種後、24 ~ 28℃ で 72 時間、120 rpm の往復振盪機上で培養した。これを種とし 0.007 培地 100 ml が入った 500 ml 容積口フラスコに 5 倍量接種し 24 ~ 28℃ で 24 時間往復振盪機上で培養した。この培養液から低速遠心で菌糸体のペレットを得、これを 20 ml の P 培地 (320 mM 蔗糖, 25 mM TES 緩衝液, 70 mM 食塩, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM $CaCl_2$) に懸濁し洗浄後、遠心し得られた菌

体ペレットを再び20 mlのP培地に懸濁した。この菌体懸濁液に40 mg/ml濃度のリゾチーム懸液を1 ml加え、28℃で1時間加温して[16]-8・SANK 81185株のプロトプラストが生成した。プロトプラストと未溶解の菌糸体の混合物は、これをグラスフィルター(303)にて自然ろ過しプロトプラストを多量に含有したプロトプラスト液を得、これを低速遠心しペレットを再びP培地に懸濁した。この操作を3回繰返し十分洗浄することにより所望のプロトプラスト液を含有するプロトプラスト液を調製した。

形質転換は、先に調製した形質転換用試料を用いて、実施例1に記載した方法によつて行なつた。形質転換操作を終了したプロトプラストを通直懸濁しR₂MP再生培地(培地組成は実施例1に記載)上に塗布した。R₂MP寒天平板上に塗布後、28℃で20時間培養したR₂MP寒天平板上に最終濃度50 µg/mlとなるようにチオペブチンを加えた軟寒天R₃培地(培地組成は実施例1に記載)を3 ml重層した。重層後、

た。

培地組成がグルコース0.4%, 麦芽エキス1.0%及び酵母エキス0.4%であつてチオペブチンを25 µg/mlになるよう添加した培地20 mlを50 ml容枝つきフラスコに入れ、これにMEL18株の菌糸体を接種後、24~28℃で約72時間120 rpmの往復振盪機上で培養した。次に菌糸体回収用培地組成がグリセロール0.4%, カザミノ酸0.4%, 酵母エキス0.5%, 麦芽エキス0.1%, MgSO₄ 0.1%, CaCl₂・2H₂O 0.01%, KH₂PO₄ 0.2%及びNa₂HPO₄・12H₂O 0.8% (pH7.2に調整)であつて、チオペブチンを25 µg/mlになるよう添加した培地100 mlを500 ml容枝口フラスコに入れこれに上記培地培養の懸濁液を培地の1~5%相当量を接種し、24~28℃で24~48時間往復振盪機上で培養した。

この培養液から低速遠心(例えば10,000g, 4℃, 20分)で菌糸体を分離し、上澄液を傾斜で除いて菌糸体ペレットを得た。プラスミド

該寒天平板を28℃で培養を継続するとチオペブチンに耐性を示す300の形質転換株の生育がみられた。その中でメラニン色素を産生する株が1株認められた。これらの株から分離したプラスミドは130から1540ベース・ペア(bp)のDNA断片を保持しており、それぞれpMEL18からpMEL24までに命名された。なおこれらのプラスミドpMEL18からpMEL24までが宿主の[16]-8・SANK 81185株にメラニン色素産生を付与することは再形質転換によつて確認された。

これらの7つのプラスミドのうちpMEL18は130 bpのDNA断片をもち、且つこの130 bpの断片中にはBgl IIもしくはSac Iの制限酵素認識部位が認められないことから、この部位を用いたクローニングベクターとして、PIJ 702を用いることの出来ない宿主にも使用出来る。純粋なプラスミドpMEL18の抽出、精製のための培養は、pMEL18を保持する形質転換体(MEL18株)を用いて以下の通り行なわれ

pMEL18の抽出精製は、該菌糸体ペレットを再懸濁したものより実施例3に記載した方法に基づいて行ない純粋なプラスミドpMEL18を得た。

組み換えプラスミドにおける挿入DNA断片の大きさはアガロース・ゲル電気泳動によつて算出された。即ち、組み換えプラスミド0.5 µgを制限酵素Sph Iで切断することにより、ベクタープラスミドとして用いたPIJ 702の線状化した5.8キロボースの断片と130 bpの挿入DNA断片の2本のバンドが生成した。分子重マーカースとしてラムダDNAのHind III切断断片またはΦX174 DNAのBam HI切断断片を用い、挿入DNA断片の大きさによつてアガロース・ゲルの濃度を0.8%, 1.2%, 2%と変えて電気泳動し分子量マーカの移動度から挿入DNA断片の大きさを測定した。

このようにして得られたプラスミドpMEL18はストレプトミセス・リビダンスSANK 83086に導入し、ストレプトミセス・リビダンスSANK 80587として寄託されている(微生物研究所

1111号)。

4. 図面の簡単な説明

第1図はML-238B Naの8 β 位を水酸化しCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450の遺伝子を含有する約7.1 kbのDNA断片の制限酵素切断地図である。

图中、SaはSac I、KはKpn I、PはPst I、MはMlu I、SpはSph I、XはXho I、EはEcoR IおよびBcはBcl Iによる切断点を示す。数字は各制限酵素切断位置間の距離を示しKbで表わしている。

第2図は組み換えプラスミドpHYO1の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)として用いたpMEL18に存在するBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素切断位置を表わしている。斜線部分はプラスミドpHYO2およびプラスミドpHYO21の挿入DNA断片との相同領域を表わしている。

第3図は組み換えプラスミドpHYO2の制限酵

DNA断片を除去したものである。

第6図は組み換えプラスミドpHYO23の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHYO21のMluI消化で生じる約3.6 Kbと約0.9 KbのDNA断片を除去したものである。

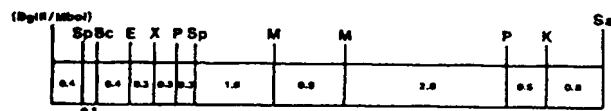
第7図はプラスミドpHYO21の持つ挿入DNA断片約7.1 KbにおけるチトクロームP-450遺伝子の局在部位の検討結果を示したものである。各プラスミドによって形質転換された宿主、ストレプトミセス・リビダンスにおける変換酵素活性とチトクロームP-450産生との関係が示されている。图中、黒線はベクターDNA断片、白線は挿入DNA断片を表わし、点線は除去されたDNA断片の領域を表わしている。

素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。斜線部分はプラスミドpHYO1の挿入DNA断片との相同領域を表わしている。

第4図は組み換えプラスミドpHYO21の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHYO2のSac I消化で生じる約2.4 KbのDNA断片を除去したものである。斜線部分はプラスミドpHYO2の斜線部分と同一である。

第5図は組み換えプラスミドpHYO22の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHYO21のSph I消化で生じる約1.5 Kbの

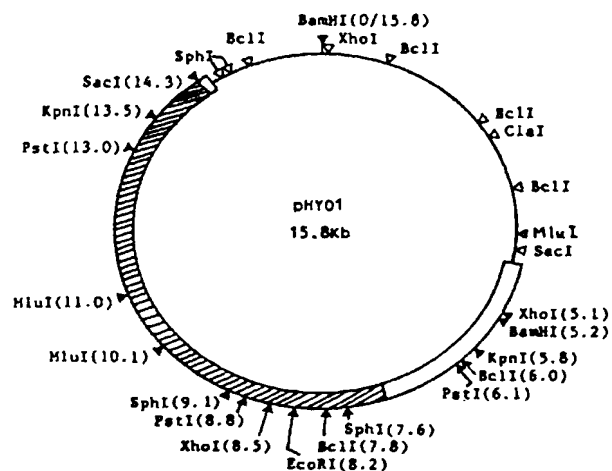
第1図



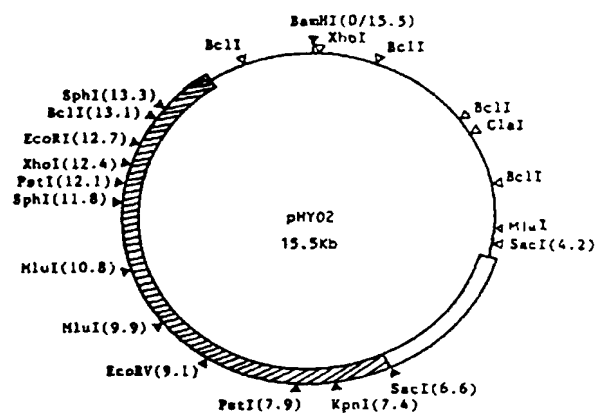
特許出願人 三井株式会社

代理人 弁理士 櫻出 庄治

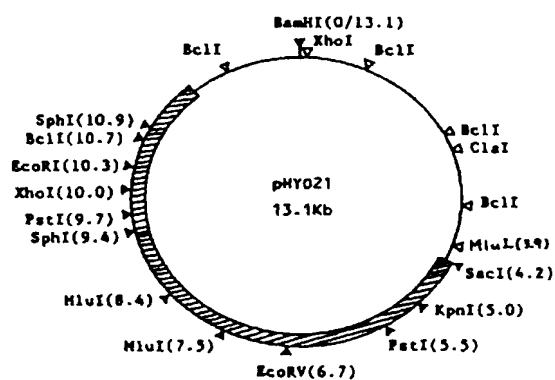
第2図



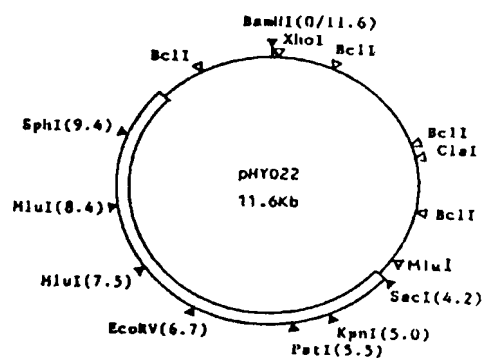
第3図



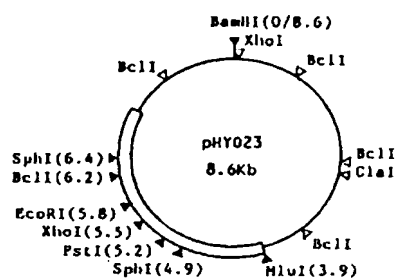
第4図



第5図



第 6 図



第 7 図

外プロ-4 P-450 遺伝子の局在部位の検討

